

核糖体 S6 蛋白激酶 p90^{rsk} 与卵母细胞减数分裂*

范衡宇 佟超 孙青原**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径对减数分裂有重要调节作用, p90^{rsk} 是迄今研究最清楚的 MAPK 下游靶分子, 介导 MAPK 途径在卵母细胞减数分裂中的多种功能, 包括卵母细胞减数分裂的启动、M I / M II 期转化和 M II 期阻滞的维持等. p90^{rsk} 的磷酸化是 MAPK 激活的结果, 而细胞退出减数分裂时, p90^{rsk} 的去磷酸化也发生在 MAPK 失活以后. 介绍了在卵母细胞中 p90^{rsk} 的研究进展.

关键词 p90^{rsk}, 卵母细胞, 减数分裂, MAPK

学科分类号 Q492, Q516

20 世纪 90 年代初, 人们发现了丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 在卵母细胞减数分裂中的重要作用, 这是继发现成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 以来对卵母细胞细胞周期研究的又一重大突破. 但是 MAPK 途径通过哪些靶分子发挥作用还远不如 MPF 研究得清楚. 核糖体 S6 蛋白激酶 p90^{rsk} 是一个分子质量约 90 ku 的蛋白激酶家族, 也叫 MAPK 依赖的蛋白激酶 1 (MAPK activated protein kinase 1, MAPKAPK 1), 是目前了解最清楚的 MAPK 生理性底物. 虽然对 p90^{rsk} 的研究从 20 世纪 90 年代中叶才起步, 但目前已取得了一些令人鼓舞的结果.

1 p90^{rsk} 的生化特性

p90^{rsk} 最早发现于非洲爪蟾卵母细胞中, 因能在体外磷酸化核糖体 40 S 亚单位的 S6 蛋白而得名. 但目前认为在体内 S6 蛋白的磷酸化主要是由另一个 S6 蛋白激酶家族 p70^{s6k}/p85^{s6k} 的成员所催化. p90^{rsk} 与 p70^{s6k}/p85^{s6k} 只有部分同源性, 它们的调节机制、底物专一性和生理靶分子都迥异.

在静息体细胞中, MAPK 和 p90^{rsk} 的激活是细胞对胞外刺激做出的早期反应, 而且在活化后的细胞中发现 MAPK 和 p90^{rsk} 向核内迁移. p90^{rsk} 在核内可以磷酸化组蛋白 H3、转录因子 c-Jun、c-Fos、Elk-1、cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-responsive element binding protein, CREB) 以及 Nur-77 的 DNA 结合区. 这些结果都暗示着 p90^{rsk} 可能是细胞 G0/G1 期转化的转录激活因子.

p90^{rsk} 与大多数蛋白激酶的不同之处是具有两

个独立的激酶结构域, p90^{rsk} 通过 N 端激酶结构域行使底物磷酸化功能, 但 C 端结构域也是 p90^{rsk} 充分激活所必需的. 在 p90^{rsk} 的 C 端有一个自身抑制性的 α 螺旋结构域, 负责阻止其自身磷酸化. 在体细胞、和爪蟾、小鼠、大鼠卵母细胞中, MAPK 是主要的 p90^{rsk} 激酶, 它磷酸化 p90^{rsk} 的 Ser³⁶⁹ 和 Ser⁵⁷⁷ 两个氨基酸残基. p90^{rsk} 通过 C 端一个保守肽段与 MAPK 结合, 被 MAPK 磷酸化激活后, p90^{rsk} 的 C 端激酶结构域自身磷酸化其他氨基酸残基, 导致 N 端激酶结构域活化. 活化后的 p90^{rsk} 转位到细胞核中, 磷酸化各种核蛋白. MAPK 本身没有核定位信号, 但 p90^{rsk} 含有核定位信号序列, 并且可与 MAPK 结合. 在爪蟾卵母细胞中, 未被磷酸化的 MAPK 有半数与 p90^{rsk} 以异二聚体形式存在, 因此推测 p90^{rsk} 还是 MAPK 的伴侣蛋白, 将活化的 MAPK 带入核内^[1].

2 p90^{rsk} 与卵母细胞成熟的启动

在脊椎动物卵巢中, 卵母细胞阻滞在减数第一次分裂的 G2 期, 也称生发泡 (germinal vesicle, GV) 期. 在激素诱导下卵母细胞恢复减数分裂, 生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD), 排放第一极体并发育至减数第二次分裂中期 (M II) 期, 这一发育过程称为卵母细胞成熟. 成熟的卵母细胞从卵巢中排出, 并再次发生减数分裂

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999055902) 和中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KSCX2-SW-303).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62563923, E-mail: sunqy1@yahoo.com

收稿日期: 2002-01-17, 接受日期: 2002-02-26

阻滞直至受精或孤雌活化。

处于 G2 期阻滞的爪蟾卵母细胞中具有前-MPF (pre-MPF) 的贮存库, 前-MPF 由于 p34 亚基的 Thr14 和 Tyr15 两个位点处于磷酸化状态而无活性, 这说明 p34 抑制激酶 Wee1 和 Myt1 对于卵母细胞的 G2/M 转化具有重要作用。Palmer 等^[2] (1998 年) 发现, Myt1 的 C 端调节结构域与磷酸化的 p90^{rk} 特异性结合, 形成复合物。p90^{rk} 使 Myt1 的 C 端磷酸化, 从而抑制其活性。该结果表明, 在卵母细胞成熟过程中, MAPK 活化 p90^{rk}, 后者再抑制 Myt1, 从而导致 MPF 激活和 G2/M 转化。

在小鼠卵母细胞成熟过程中, 可以用免疫蛋白印迹方法检测到 3 条不同电泳迁移率的 p90^{rk} 条带, 这是由于磷酸化状态不同所导致的。GV 期卵母细胞中 p90^{rk} 以无活性的去磷酸化形式存在。在 GVBD 30 min 后 p90^{rk} 开始部分磷酸化, 在 GVBD 后 3 h 达到最高磷酸化程度^[3]。因为 MAPK 在 GVBD 后 2 h 才开始激活, 所以人们认为 p90^{rk} 的最初磷酸化是不依赖 MAPK 活性的。目前, 具体哪种激酶导致 p90^{rk} 的初始磷酸化还不清楚, MPF 可能是一个备择分子。在 *c-mos* 基因敲除的小鼠中, 卵母细胞成熟过程中 MAPK 不激活, p90^{rk} 也不能被充分磷酸化, 说明 MAPK 活性是 p90^{rk} 完全活化所必需的。

最近, 我们实验室研究了 p90^{rk} 在大鼠卵母细胞成熟与活化过程中的磷酸化变化, 及其与 MAPK 之间的关系, 结果发现, 在卵母细胞成熟过程中 p90^{rk} 的磷酸化分两步进行: 在 MAPK 激活之前, p90^{rk} 就通过一个不依赖 MAPK 的途径发生部分磷酸化, 在 MAPK 激活以后 p90^{rk} 才发生完全磷酸化。同时还发现, 蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸 (okadaic acid, OA) 在促进 MAPK 激活的同时也加速 p90^{rk} 磷酸化, 蛋白质合成抑制剂放线菌酮在抑制 MAPK 激活的同时也阻止 p90^{rk} 磷酸化^[4]。这与小鼠和爪蟾中的情况相同, 说明伴随着 MAPK 激活的 p90^{rk} 磷酸化, 可能是脊椎动物卵母细胞中的一个保守机制。

M I 期的进入需要 MPF 活性的持续增加, 这依赖于 GVBD 以后的某些蛋白质翻译事件, 这些成熟特异性的翻译受到几个层次的调节, 其中一个重要方面是使某些调节翻译速率的蛋白质因子, 如 eIF-4F、核糖体 S6 蛋白等发生磷酸化。翻译起始因子复合物 eIF-4F 参与 5' 端帽子依赖的翻译过程,

负责识别 mRNA 翻译的速率强弱信号。eIF-4F 由 3 个亚基组成, 其中 eIF4E 亚基与 mRNA 的 5' 端帽子识别并结合。在小鼠、爪蟾和海星中都发现, eIF4E 在卵母细胞恢复减数分裂时磷酸化, 使 mRNA 的翻译速率增加。在小鼠卵母细胞中, S6 蛋白激酶活性在 GVBD 后迅速上升, 并在 M I 期达到峰值。eIF4E 也在 GVBD 后发生磷酸化。但是如果在卵母细胞培养液中加入蛋白质合成抑制剂放线菌酮, 虽然 GVBD 仍能发生, 但 MAPK 和 p90^{rk} 不激活, eIF4E 也不能发生磷酸化。反之, 如果用 OA 处理卵母细胞, 使 MAPK 提早激活, eIF4E 也随之被迅速磷酸化^[5]。这些结果都表明, MAPK 和 p90^{rk} 可能参与调节着卵母细胞成熟过程中的蛋白质翻译。

3 p90^{rk} 与 M I / M II 期转化及 M II 阻滞

减数分裂的最大特点是在两次减数分裂之间细胞不进入 S 期。在 M I / M II 转化期 MPF 水平降低, 但 MAPK 仍维持高活性, 因此人们认为 MAPK 对于阻止两次减数分裂之间的染色体解凝集和 DNA 复制具有重要作用。用 MAPK 途径的抑制剂 U0126 处理爪蟾卵母细胞, 可以抑制 MAPK 激活, 此时细胞仍能进入 M I 期, 但不能形成中期纺锤体、不能积累高水平的 cyclin B, 也不能使后期促进复合物的组分 Cdc27 发生磷酸化。此种卵母细胞将随后进入 S 期而不是 M II 期。但是向这些卵母细胞中注射持久激活的 p90^{rk} 分子, 就可以纠正以上所有的发育缺陷, 使纺锤体形成、cyclin B 积累、Cdc27 磷酸化, 细胞进入 M II 期^[6]。以上结果说明在减数分裂的 M I / M II 转化期 p90^{rk} 同样介导着 MAPK 的大部分生化功能。

在脊椎动物卵母细胞中存在细胞静止因子 (cytostatic factor, CSF), 使卵母细胞的减数分裂阻滞在 M II 期。目前认为 CSF 不是单一因子, 而是多种蛋白激酶的组合。虽然对 CSF 的本质还未完全认识, 但已知 Mos-MAPK-p90^{rk} 通路是其关键成分。向爪蟾卵裂球中注射持续活化的 MAPK, 可以使有丝分裂阻滞在 M 期, 如果用免疫共沉淀方法除去细胞中的 p90^{rk}, 活化的 MAPK 就不再能够诱导 M 期阻滞, 但向细胞中重新添加 p90^{rk} 可以恢复细胞在 M 期阻滞的能力^[7]。如果使爪蟾卵裂球表达持续活化的 p90^{rk}, 也能使卵裂球的细胞周期阻滞在 M 期^[8]。这些结果都表明, MAPK 途径通过 p90^{rk} 使细胞阻滞在 M 期, 发挥 CSF 功能, 并

且 $p90^{rsk}$ 是 MAPK 发挥 CSF 功能所需的唯一底物。

4 $p90^{rsk}$ 与减数分裂的退出

在孤雌活化后的小鼠卵母细胞中, 原核形成以前 0.5~1 h MAPK 开始去磷酸化, 并在原核形成后 1 h 完全失活。 $p90^{rsk}$ 的去磷酸化发生在原核形成后 1 h, 并在此后缓慢失活直至第一次有丝分裂开始。在大鼠卵母细胞中, $p90^{rsk}$ 的去磷酸化发生在孤雌激活后 3 h, 这时 MAPK 已经完全去磷酸化。在那些孤雌活化后未能形成原核的卵母细胞中, MAPK 和 $p90^{rsk}$ 都不能发生去磷酸化。而且在孤雌活化后, 蛋白磷酸酶抑制剂 OA 可以抑制原核形成和 MAPK、 $p90^{rsk}$ 去磷酸化。从以上结果我们推断, 卵母细胞活化后, $p90^{rsk}$ 的去磷酸化发生在 MAPK 失活之后, MAPK 的失活使 $p90^{rsk}$ 不能继续维持磷酸化状态。虽然到目前为止还没有在卵母细胞中发现 $p90^{rsk}$ 专一性的蛋白磷酸酶, 但显然有一种对 OA 敏感的蛋白磷酸酶负责在卵母细胞退出减数分裂时灭活 $p90^{rsk}$ 。

在第一次有丝分裂的 M 期, $p90^{rsk}$ 又被重新不完全磷酸化, 形成 2-细胞胚胎后再度去磷酸化。由于 MAPK 在胚胎的卵裂过程中不被激活, 可知 MAPK 与卵裂期的 $p90^{rsk}$ 磷酸化没有关系。进一步的实验发现, 用抗微管聚合的药物 nocodazol 处理 1-细胞胚胎, 可使其细胞周期阻滞在 M 期, 此时不完全磷酸化的 $p90^{rsk}$ 明显增多。Nocodazol 处理细胞后 p34 活性增强, 这可能是 $p90^{rsk}$ 发生不完全磷酸化的原因, 但由于此时 MAPK 不激活, $p90^{rsk}$ 也不能完全磷酸化。 $p90^{rsk}$ 参与的细胞内信号传递过程见图 1。

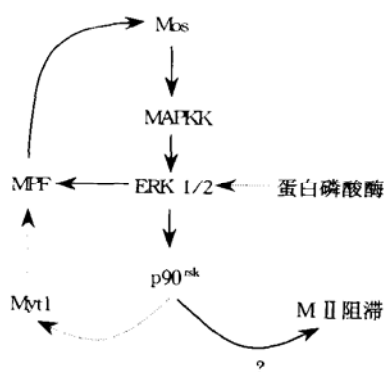


Fig. 1 Roles of $p90^{rsk}$ in intracellular signal transduction

图 1 $p90^{rsk}$ 参与的细胞内信号传递过程

→ : 激活; > : 抑制。

根据最新资料, $p90^{rsk}$ 基因敲除的小鼠已被培育出来, 该种小鼠虽然体重比野生型小鼠轻, 且肌细胞糖代谢存在一些障碍, 但仍然可育, 说明 $p90^{rsk}$ 的缺失还不足以完全阻止卵子的发育和受精^[9]。笔者认为, 动物体内很多重要的生化过程都存在替代途径, 对基因敲除的结果还需做出详细分析, 这种小鼠的卵母细胞减数分裂过程还有待深入研究, 因为“可育”并不意味着一切正常。

虽然 $p90^{rsk}$ 作为减数分裂过程中 MAPK 的靶分子已确定无疑, 但 $p90^{rsk}$ 以哪些分子为底物发挥其生理功能还所知甚少。许多科学家认为, 彻底阐明 MAPK 途径在卵母细胞减数分裂过程中的作用机理, 目前的关键在于寻找 $p90^{rsk}$ 的下游靶分子。

参 考 文 献

- 1 Hsiao K M, Chou S Y, Shih S J, *et al.* Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (12): 5480~ 5484
- 2 Palmer A, Gavin A C, Nebreda A R. A link between MAP kinase and p34 (cdc2) / cyclin B during oocyte maturation: p90 (rsk) phosphorylates and inactivates the p34 (cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J*, 1998, **17** (17): 5037~ 5047
- 3 Kalab P, Kubiak J Z, Verlhac M H, *et al.* Activation of $p90^{rsk}$ during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development*, 1996, **122** (6): 1957~ 1964
- 4 Tan X, Chen D Y, Yang Z, *et al.* Phosphorylation of $p90^{rsk}$ during meiotic maturation and parthenogenetic activation of rat oocytes: correlation with MAP kinases. *Zygote*, 2001, **9** (2): 269~ 276
- 5 Gavin A C, Schorderet-Slatkine S. Ribosomal S6 kinase $p90^{rsk}$ and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1997, **46** (3): 383~ 391
- 6 Gross S D, Schwab M S, Taiw F E, *et al.* The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by $p90^{rsk}$. *Current Biol*, 2000, **10** (3): 430~ 438
- 7 Bhatt R R, Ferrell J E Jr. The protein kinase $p90^{rsk}$ as an essential mediator of cytotstatic factor activity. *Science*, 1999, **286** (22): 1362~ 1365
- 8 Gross S D, Schwab M S, Lewellyn A L, *et al.* Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase $p90^{rsk}$. *Science*, 1999, **286** (22): 1365~ 1367
- 9 Dufresne S D, Bjorbaek C, El-Haschimi K, *et al.* Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (1): 81~ 87

Roles of Ribosome S6 Protein Kinase p90^{rsk} in Oocyte Meiosis*

FAN Heng-Yu, TONG Chao, SUN Qing-Yuan**

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway plays important roles in the meiosis of oocytes. p90^{rsk} is the best known target of MAPK, which mediates multiple functions of MAPK during oocyte meiotic maturation, including the resumption of meiosis, the M I / M II transition and the sustain of M II arrest. The phosphorylation of p90^{rsk} is the result of MAPK activation, and the dephosphorylation of p90^{rsk} is following the inactivation of MAPK at the end of meiosis. The progress of p90^{rsk} in oocytes is introduced.

Key words p90^{rsk}, oocyte, meiosis, MAPK

* This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999055902) and Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-303).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62563923, E-mail: sunqy1@yahoo.com

Received: January 17, 2002 Accepted: February 26, 2002